

全国高等院校医学实验教学规划教材

TM
案例版

临床检验技能学 课程群实验

主编 伊正君 李 猛



科学出版社

全国高等院校医学实验教学规划教材

案例版TM

临床检验技能学

课程群实验

主 编 伊正君 李 猛

副主编 张 霞 宋 伟 孙艳丽 付玉荣

编 委 (以姓氏笔画为序)

王保强(潍坊医学院附属医院)

李 猛(潍坊医学院)

王洪省(潍坊医学院)

杨桂茂(潍坊医学院附属医院)

付玉荣(潍坊医学院)

宋 伟(潍坊医学院)

伊 鑫(潍坊医学院附属医院)

张 霞(潍坊医学院)

伊正君(潍坊医学院)

张玉芝(潍坊医学院附属医院)

刘胜男(潍坊医学院附属医院)

张旭光(潍坊医学院附属医院)

孙艳丽(潍坊医学院)

官旭俊(潍坊医学院附属医院)

孙铭艳(潍坊医学院附属医院)

高昆山(潍坊医学院附属医院)

李 倩(潍坊医学院)

彭效祥(潍坊医学院)

科 学 出 版 社

北 京

内 容 简 介

本教材是科学出版社出版的《临床检验技能学》基础上的递进升级版,在知识、技能、综合素质培养上对学生提出了更高要求。

该教材特色:引入大量临床案例、实验项目整合优化、引入创新实验项目。教材共分二篇:第一篇综合性实验,包括临床基础检验学案例分析、临床生物化学检验案例分析、临床免疫学检验案例分析、临床微生物学检验案例分析、临床输血学检验案例分析、临床血液学检验案例分析、临床分子诊断学案例分析与临床实验室管理学案例分析,共8章,包括24个案例、53个实验项目。第二篇为创新性试验,共1章,包括8个实验项目。

该教材适合医学检验技术专业本科生、专科生使用。

图书在版编目(CIP)数据

临床检验技能学课程群实验 / 伊正君, 李猛主编. —北京: 科学出版社, 2017.3

全国高等院校医学实验教学规划教材

ISBN 978-7-03-051872-9

I. ①临… II. ①伊… ②李… III. ①临床医学—医学检验—实验—高等学校—教材 IV. ①R466.1

中国版本图书馆 CIP 数据核字(2017)第 035528 号

责任编辑: 王 超 胡治国 / 责任校对: 张凤琴

责任印制: 张 伟 / 封面设计: 陈 敬

科 学 出 版 社 出 版

北京东黄城根北街 16 号

邮政编码: 100717

<http://www.sciencep.com>

北京中石油彩色印刷有限责任公司 印刷

科学出版社发行 各地新华书店经销

*

2017 年 3 月第 一 版 开本: 787×1092 1/16

2017 年 3 月第一次印刷 印张: 7 1/2

字数: 192 000

定价: 38.00 元

(如有印装质量问题, 我社负责调换)

前 言

医学检验技术专业是一门临床实践性很强的技术类专业,对医学检验技术专业学生而言,在专业理论基础上的实践技能水平直接关系到就业质量,提高学生的临床检验技能不仅是提升学生含金量的重要举措,对于更好的服务临床医学研究和诊疗也有积极意义。

为满足医学检验技术专业学生的创新性应用型人才培养的要求,前期我们编写了国内第一本关于临床检验技能学的教材《临床检验技能学》。该教材为《临床检验技能学》的递进升级版,在知识、技能、综合素质培养上对学生提出了更高要求。该教材最突出的特点一是引入大量临床案例,以临床案例分析为切入点,在案例初步诊断的基础上,通过科学解析要明确案例诊断的问题从而引出支持该初步诊断所需进一步检测的临床检验项目,融合临床案例分析与检验项目检测为一体,从而培养学生的临床实践与知识运用能力;二是打破检验不同学科界线,进行一体化设计和教学内容的全面整合和优化,培养学生不同学科知识的合理架构能力与综合分析能力;三是引入创新实验培养学生的创新实践精神。

教材共分二篇:第一篇综合性实验(共八章),包括临床基础检验学案例分析、临床生物化学检验案例分析、临床免疫学检验案例分析、临床微生物学检验案例分析、临床输血学检验案例分析、临床血液学检验案例分析、临床分子诊断学案例分析与临床实验室管理学案例分析,共24个案例53个实验项目;目的是提升学生利用所学知识 with 技能分析临床问题与解决临床问题的逻辑思维技能、职业素养等综合技能。第二篇为创新性试验,共8个实验项目;目的是培养学生的创新实践能力。

据检索,本教材是当前我们编写的国内第二本关于临床检验技能学的教材,尽管编者已倾尽全力,但限于学术水平、编写能力有限,书中不足与错误在所难免。恳请读者和同道们给予批评指正。教材的编写工作之所以能顺利完成,科学出版社给予了大力支持与帮助,在此表示衷心感谢!

伊正君

2017年2月

目 录

第一篇 综合性试验	1
第一章 临床基础检验学案例分析	1
实验一 大便常规检查	1
实验二 凝血功能测定	3
实验三 腹水物理学检查	4
实验四 腹水黏蛋白试验	5
实验五 脑脊液物理学检查	7
实验六 脑脊液球蛋白试验	8
第二章 临床生物化学检验案例分析	9
实验一 脲酶-谷氨酸脱氢酶偶联速率法测定血清尿素	9
实验二 碱性苦味酸法测定血清肌酐	11
实验三 尿酸酶-过氧化物酶偶联法测定血清尿酸	12
实验四 N-乙酰半胱氨酸法(NAC)测定血清肌酸激酶	13
实验五 免疫抑制法测定肌酸激酶同工酶(CK-MB)的活性	15
实验六 离子选择电极法测定血清钾、钠、氯	16
实验七 葡萄糖氧化酶法测定血清葡萄糖	18
实验八 口服葡萄糖耐量试验(OGTT)	19
实验九 血清丙氨酸氨基转移酶测定	21
实验十 双缩脲法测定血清总蛋白	22
实验十一 重氮法测定血清胆红素	24
第三章 临床免疫学检验案例分析	26
实验一 间接免疫荧光法检测 ANA	26
实验二 免疫印迹试验	28
实验三 免疫浊度法检测补体	30
实验四 时间分辨荧光免疫法检测乙肝表面抗原	31
实验五 电化学发光法检测 AFP	33
实验六 酶联免疫吸附(ELISA)法检测 CA199	34
实验七 胶体金法检测结核分枝杆菌抗体	36
实验八 酶联免疫斑点(ELISPOT)检测	37
第四章 临床微生物学检验案例分析	40
实验一 尿液标本的细菌定量培养	41
实验二 尿液标本的细菌学鉴定与药物敏感性试验	43
实验三 痰涂片结核杆菌检测	46

实验四 痰标本结核分枝杆菌核酸检测	47
实验五 真菌(1-3)- β -D-葡聚糖检测	50
第五章 临床输血学检验案例分析	52
实验一 ABO 血型、RhD 血型的鉴定	53
实验二 红细胞不规则抗体筛查试验	54
实验三 输血前交叉配合试验	56
实验四 新生儿红细胞直接抗球蛋白试验	60
实验五 新生儿血清游离抗体检测	61
实验六 热放散试验	63
实验七 乙醚放散试验	64
实验八 红细胞不规则抗体鉴定试验	66
实验九 红细胞直接抗球蛋白试验	68
实验十 血型抗体效价测定	69
实验十一 血浆置换	71
第六章 临床血液学检验案例分析	76
实验一 血清铁蛋白检测	77
实验二 细胞化学染色检查(以 POX 为例)	78
实验三 骨髓细胞染色体检查	79
实验四 白血病融合基因 BCR/ABL p210 检测	81
实验五 嗜水气单胞菌溶素变异体检测	84
第七章 临床分子诊断学案例分析	86
实验一 人外周血染色体 G 显带检查	87
实验二 封闭抗体检测-流式细胞仪法	88
实验三 荧光定量 PCR 法检测解脲脲原体	90
实验四 DNA 亲权鉴定	92
第八章 临床实验室管理学案例分析	96
实验一 室内质控图的制作及质控规则	96
实验二 钩状效应的解决方案	98
实验三 室间质评	99
第二篇 创新性试验	102
实验一 重组人组织型纤溶酶原激活物的制备	102
实验二 伤寒沙门菌 O 抗体竞争 ELISA 检测方法的建立	103
实验三 HCG 免疫胶体金检测方法的建立	105
实验四 荧光标记 CD34 抗体的制备	106
实验五 甲胎蛋白化学发光免疫检测方法的建立	108
实验六 体外构建分枝杆菌肉芽肿模型	110
实验七 嗜铜绿假单胞菌烈性噬菌体的分离纯化	111
实验八 曲霉菌 28S rDNA D1-D2 荧光定量 PCR 检测方法的建立	113

第一篇 综合性试验

第一章 临床基础检验学案例分析

【案例 1】 患者，男，39 岁。

主诉：半个月前自觉腹胀、乏力，入院前 2 天加重，出现恶心、黑便。

既往史：2 年前患血吸虫病。

体格检查：T 36.5℃，P 64 次/分，R 16 次/分，BP 106/61mmHg。神志清醒，精神差，心肺(-)，脾肋下 2 指可触及，质中等，全腹压痛，移动性浊音(+)，双下肢水肿。

实验室检查：

粪便潜血：阳性。

血液检查：红细胞计数(RBC) $3.28 \times 10^{12}/L$ ，血红蛋白(Hb) 96g/L，白细胞计数(WBC) $4.03 \times 10^9/L$ ，血小板计数(PLT) $84 \times 10^9/L$ ，中性分叶核 0.70，中性杆状核 0.01，淋巴细胞(L) 0.17，单核细胞(M) 0.02，嗜酸粒细胞(E) 0.10。

初步诊断：血吸虫病。

【问题】 为明确诊断，首先应该做的实验室检测是什么？

【解析】 患者既往病史有血吸虫病，该病会引起肝硬化，门静脉高压，进而引起双下肢水肿，同时该患者嗜酸粒细胞增高，故怀疑为血吸虫病，因此首先对该患者进行大便常规及潜血检查；大便常规主要检测是否有血吸虫虫卵，如有，注意虫卵的形态。

实验一 大便常规检查

一、实验原理

取患者约黄豆粒大小粪便(带有脓血黏液部分)，用生理盐水制成粪便悬浊液进行粪便有形成分检查；检查内容主要有红细胞、白细胞、虫卵等。

血吸虫虫卵形态：淡黄色，椭圆形，无小盖，卵壳均匀，表面常黏附许多宿主组织残留物，侧棘短小，卵内含有成熟毛蚴。

二、实验材料、试剂与仪器

生理盐水、载玻片、滴管、显微镜、盖玻片、竹签、无菌杯。

三、操作步骤

(1) 留取患者带脓血或黏液的粪便，黄豆粒大小即可。如没有黏液或脓血，应从粪便表面

及深部多部位取材。

(2) 在载玻片上滴 2 滴生理盐水，用竹签挑取步骤(1)中留取粪便制成粪便悬浊液。

(3) 盖上盖玻片，显微镜下观察粪便有形成分。

四、结果分析

对粪便中的有形成分，如红细胞、白细胞、虫卵等进行检查，如果有血吸虫虫卵，说明该患者为血吸虫病；如未发现虫卵，也不能排除血吸虫病的可能，因为在血吸虫病晚期较难在粪便中查找到虫卵，此时应多次采样送检(>3 次)，阴性时加做免疫血清学实验进行确诊。

在该案例中，在患者粪便中可见到大量红细胞、白细胞，但多次送检未见虫卵，并不能完全排除血吸虫病的可能，该患者后加做免疫血清学实验得到确诊。

五、注意事项

(1) 注意留取带脓血或黏液粪便。如没有黏液或脓血应从粪便表面及深部多部位取材。

(2) 制备粪便悬浊液时也应挑取已留取的粪便中带脓血或黏液的部分。

【案例结论分析】 该患者粪便检查结果显示：潜血阳性、白细胞增高，虽然未见血吸虫虫卵，但结合前述的血吸虫感染史、嗜酸粒细胞增高、血压增高、双下肢水肿，推断患者可能为血吸虫病晚期，故此时可能查不到血吸虫虫卵。确证时通过免疫学方法检测血吸虫抗体或行直肠镜活组织检查。

【案例 2】 患者，男，40 岁，工人。

主诉：乏力、食欲缺乏 3 个月，腹胀、黄疸 1 周，皮下出血和瘀斑 3 天入院。

既往史：家族中无遗传性疾病史。

体格检查：T 38.9℃，P 92 次/分，R 26 次/分，BP 128/80mmHg。神志清醒，精神萎靡，急性病容，消瘦。全身皮肤、黏膜重度黄染，胸部和双下肢皮下散在出血点和瘀斑，全身浅表淋巴结均未触及，心、肺正常。腹膨隆，肝区深压痛(+)，肝右肋下 3cm，质中、边缘光滑。脾左肋下未及。移动性浊音(+)，肠鸣音 2~3 次/分。

辅助检查

腹部 B 超提示：肝右肋下 3cm 伴中度腹水，脾正常。胸片、心电图未见明显异常。

实验室检查：

血常规：WBC $13.2 \times 10^9/L$ ，PLT $172 \times 10^9/L$ 。

尿常规：尿胆原阳性、尿胆红素阳性。

大便常规：粪胆原阳性。

生化及免疫学检查：尿素氮(BUN) 16.5mmol/L、肌酐(Cr) 154μmol/L、血糖 8.7mmol/L，HBsAg(+)、HBsAb(-)、HBeAg(+)、HBeAb(-)、HBcAb(+)，谷草转氨酶(AST) 670U/L，谷丙转氨酶(ALT) 395U/L，总胆红素(TBIL) 160μmol/L，结合胆红素(DBIL) 91.3μmol/L，非结合胆红素(IBIL) 68.7μmol/L，血清总蛋白(TP) 55g/L，白蛋白(ALB) 21g/L，球蛋白(GLB) 34g/L。

初步诊断：乙型肝炎。

【问题】 本例皮下散在出血点和瘀斑的最主要原因是什么？为进一步证实出血原因及治疗出血，还需要做哪些实验室检查？

【解析】 从上述病例分析可知,患者处于乙型肝炎急性期,肝细胞大量被破坏,肝功能明显降低。一方面肝脏合成凝血因子减少,另一方面清除抗凝物质能力降低,从而导致凝血功能异常而引起出血。在本案例中,患者皮下出现散在出血点和瘀斑,其病因最可能是由于肝脏疾病引起的凝血功能障碍出血,因此,要进行凝血功能检查,一般包括活化部分凝血活酶时间(APTT)、凝血酶原时间(PT)、凝血酶时间(TT)、纤维蛋白原(FIB)、D-二聚体(DD)等检查项目。此外,B超结果显示患者出现腹水,要对腹水出现的原因进行探查,因此要进行腹水检查。

实验二 凝血功能测定

一、实验原理

(1)凝血酶原时间(prothrombin time, PT)测定原理:在待测血浆中,加入足够量的组织因子(tissue factor, TF)和适量 Ca^{2+} ,满足外源性凝血条件,从加入 Ca^{2+} 到血浆凝固所需的时间即为PT,主要反映外源性凝血途径是否正常。

(2)活化部分凝血活酶时间(activated partial thromboplastin time, APTT)测定原理:37℃条件下,以白陶土激活XII,以脑磷脂(部分凝血活酶)代替血小板第三因子,在 Ca^{2+} 参与下,观察血浆凝固所需的时间,即为APTT,是内源性凝血系统较敏感和最为常用的筛选试验。

(3)纤维蛋白原(fibrinogen, FIB)是由肝脏合成的具有凝血功能的蛋白质,是纤维蛋白的前体,在凝血酶的作用下, α 链与 β 链分别释放出A肽和B肽,生成纤维蛋白单体。这些单体易于聚合成纤维蛋白多聚体,此时单体之间借氢键与疏水键相连。紧接着,在 Ca^{2+} 与活化的XIII因子的作用下,单体之间以共价键相连,可变成稳定的不溶性纤维蛋白凝块,完成凝血过程。

(4)D-二聚体(D-dimer, DD)是纤溶酶对纤维蛋白凝块溶解所产生的一种特异性降解产物,是继发性纤溶较好的标志物。

二、实验材料、试剂与仪器

109mmol/L 枸橼酸钠抗凝试管、采血针、压脉带、0.5%聚维酮碘、全自动血凝检测分析仪、低速医用离心机、APTT 检测试剂盒、PT 检测试剂盒、FIB 检测试剂盒、DD 检测试剂盒、洗针液、氯化钙、缓冲液、去离子水及相关质控品等。

三、操作步骤

(一)标本准备

- (1)用 109mmol/L 枸橼酸钠抗凝试管采集患者全血 1.8ml,迅速混匀。
- (2)将标本置于低速医用离心机中,3500r/min 离心 3min。

(二)仪器准备

- (1)检查仪器冲洗液、洗针液、废液桶。
- (2)打开仪器电源,开机,仪器进行自检。
- (3)根据各种试剂及质控要求复融试剂与质控品。
- (4)加装各种应用试剂。

(5) 加装质控品对仪器进行质量控制检测, 质控合格即进行实验。如不合格, 检查仪器及试剂, 再次进行质量控制检测, 直到质控通过。

(6) 加装样本, 进行检测, 并记录检测结果。

四、结果分析

(1) 凝血酶原时间(PT): 正常范围为 12~14s; 超过正常范围 3s 以上有临床意义。

(2) 活化部分凝血活酶时间(APTT): 正常范围为 22.5~40.5s。

(3) 纤维蛋白原(FIB): 正常范围为 2~4g/L。

(4) D-二聚体(DD): 正常范围为 0~0.5mg/L。

在本案例中, 测得的 PT、APTT、FIB、DD 分别为 20s、65s、0.5g/L、5 mg/L, 由此可见 PT 与 APTT 延长, FIB 减少, DD 升高。从 PT 与 APTT 延长及 FIB 减少可推知凝血途径异常, 患者有出血倾向, 这是由于肝功能受损引起的; 从 DD 升高可推知患者体内有血栓形成。

五、注意事项

(1) 检测 PT、APTT、FIB、DD 时, 用含 109mmol/L 枸橼酸钠的真空采血管(浅蓝色盖)。

(2) 采集静脉血进行 PT、APTT、FIB、DD 检测, 采血量与抗凝剂体积比为 9:1。

(3) 采血后要立刻轻轻颠倒混匀, 切勿剧烈振荡。

(4) 血凝实验结果易受多种因素(如抗凝剂、抗凝物质)的影响, 实验前后要考虑这些因素的影响。

实验三 腹水物理学检查

一、实验材料、试剂与仪器

患者腹水、显微镜、改良牛鲍计数板、微量吸管、小试管、生理盐水或红细胞稀释液、冰醋酸、白细胞稀释液、瑞氏染液或瑞-吉染液。

二、操作步骤

(1) 观察标本颜色、透明度、有无凝块。

(2) 白细胞计数

1) 去除红细胞: 在小试管内放入冰醋酸 1~2 滴, 转动试管, 使内壁黏附少许冰醋酸后倾去, 滴加混匀腹水 3~4 滴, 混匀, 放置数分钟, 破坏红细胞。

2) 充池: 用微量吸管取混匀破坏红细胞后的腹水充入血细胞计数板的 2 个计数池内。

3) 计数: 静置 2~3min 后, 低倍镜计数 2 个计数池内四周和中央大方格共 10 个大方格内的有核细胞数。

4) 计算: 10 个大方格有核细胞总数即每微升腹水中的有核细胞总数, 再换算成每升腹水中的有核细胞数。

三、结果分析

白细胞分类计数:

1. 直接分类法 有核细胞计数后, 将低倍镜转为高倍镜, 直接在高倍镜下根据细胞形态和细胞核形态进行分类, 共分类计数 100 个有核细胞, 分别计数单个核细胞(包括淋巴细胞、单核细胞及间皮细胞)和多个核细胞(粒细胞)百分率。

2. 涂片染色分类法 在抽出穿刺液后, 立即以 1000r/min 离心 5min, 取沉淀物制成均匀的薄片, 置于室温下或 37℃ 恒温箱内尽快干燥, 瑞氏染色或瑞-吉染色后油镜分类计数 100 个有核细胞。一般标本中可见到淋巴细胞、中性粒细胞、嗜酸粒细胞、间皮细胞等。

在该案例中, 患者漏出液中白细胞计数为 $16 \times 10^6/L$, 单个核细胞计数为 76%, 多个核细胞计数为 24%, 可见漏出液中白细胞数量较少, 且主要以淋巴细胞等单个核细胞为主, 说明患者可能感染病毒。

四、注意事项

(1) 有核细胞计数应包括间皮细胞。

(2) 必要时可采用细胞玻片离心沉淀仪收集细胞, 以提高白细胞分类计数的准确性。

(3) 有核细胞分类计数误差大, 尤其是陈旧性、细胞变形的标本, 故推荐采用涂片染色分类计数。

(4) 染色分类计数过程中, 若发现间皮细胞和不能分类的异常细胞应另外描述或做 HE 等染色查找肿瘤细胞。

实验四 腹水黏蛋白试验

一、实验原理

浆膜腔上皮细胞在炎症刺激下会分泌大量黏蛋白。黏蛋白是一种酸性糖蛋白, 其等电点 pH 为 3~5, 因此, 可在稀醋酸中出现白色沉淀。

二、实验材料、试剂与仪器

患者腹水、100ml 量筒、滴管、冰醋酸、蒸馏水。

三、操作步骤

(1) 加试剂: 加 2~3 滴冰醋酸于 100ml 量筒中, 再加大约 100ml 蒸馏水, 混匀, 此时溶液的 pH 为 3~5, 静置数分钟。

(2) 加标本: 垂直滴加待测标本 1 滴于量筒中。

(3) 观察结果: 立即在黑色背景下观察有无白色云雾状沉淀生成及其下降程度。

四、结果分析

阴性: 清晰, 不显雾状或有轻微白色雾状浑浊, 但在下降过程中消失。

阳性: 出现白色雾状浑浊并逐渐下沉至量筒底部不消失。

阳性程度的判断: 渐呈白雾状为(±); 可见灰白色雾状为(+); 白色薄云状为(++); 白色浓

云状为(++++).

在本案例中,黏蛋白实验结果为阴性,说明腹水性质为漏出液。

五、注意事项

(1)血性浆膜腔积液经离心沉淀后,用上清液进行检查。

(2)该实验中要选择合适量程的量筒。

(3)加入标本后立即在黑色背景下仔细观察结果。如浑浊不明显,下沉缓慢,中途消失者为阴性。

【案例结论分析】 本患者腹水检查结果中发现白细胞数量较少且主要以单个核细胞为主,黏蛋白试验为阴性,由此可确定本患者的腹水为漏出液;患者乙型肝炎标志物为典型的“大三阳”,对患者的凝血功能检测发现患者 PLT 正常,PT、APTT 等明显延长,FIB 减少,DD 增高,进一步证实出血原因为病毒性肝炎导致的肝脏损害而引起的凝血功能异常性出血;因而在治疗方面可采取治疗原发病、补充凝血因子、补充维生素等措施,治疗过程中要加强出凝血活性检测,并根据检测结果及时调整用药方案。

【案例3】 患者,男,25岁。

主诉:昏迷,检查不合作。

现病史:3天前因劳累后饮酒出现发热、寒战、剧烈头疼。4h前出现意识障碍,自言自语,回答不出问题,并出现抽搐,抽搐时双眼上翻、凝视,口吐白沫,唇周发绀,双手握拳,四肢抽动,呼之不应,持续0.5h后停止。

体格检查: T 39.1℃, P 106次/分, R 25次/分, BP 113/60mmHg。双瞳等大约0.6mm,眼底检查,视盘水肿,光反射迟钝,颈抵抗明显,双肺、心、腹、淋巴结、皮肤均无异常,膝跟腱反射亢进,右侧巴彬斯基征明显。

实验室检查:

血常规: WBC $12.2 \times 10^9/L$, PLT $129 \times 10^9/L$ 。

尿常规: 葡萄糖(Glu)(-),蛋白质(PRO)(-),酮体(KET)(-)。

大便常规: 潜血(-)。

生化及免疫学检查: 血糖 5.3mmol/L, AST 59U/L, ALT 96U/L, γ -谷氨酰转移酶(γ -GGT) 101U/L, 脑脊液免疫球蛋白 IgG 147g/L, IgA 11g/L, 脑脊液 IgM 1.12g/L, 脑脊液 TORCH 单纯疱疹病毒抗体 IgM 阳性、单纯疱疹病毒抗体 IgG 阳性。

初步诊断: 中枢神经系统感染。

【问题】 结合上述病例信息,为帮助该患者更好地诊断,需要做脑脊液检查吗?如果需要,应重点包含哪些项目?

【解析】 患者体格检查发现中枢神经系统感染症状明显,故行腰椎穿刺抽取脑脊液 6ml,分别装入3支无菌试管,立即送检,做脑脊液常规及生化检查,同时还要兼顾是否有病毒或者细菌性感染情况的发生,因而应做脑脊液细菌培养、真菌镜检及病毒学检测。

实验五 脑脊液物理学检查

一、实验材料、试剂与仪器

显微镜、改良牛鲍计数板、微量吸管、刻度吸管、小试管、生理盐水或红细胞稀释液、冰醋酸、白细胞稀释液、瑞氏染液或瑞-吉染液。

二、操作步骤

(1) 观察标本的颜色、透明度、有无凝块。

(2) 充池：直接用微量吸管吸取混匀的脑脊液，充入血细胞计数板的上下 2 个计数池内。

(3) 计数：静置 2~3min 后，低倍镜下计数 2 个计数池内四角和中央大方格共 10 个大方格内的细胞数。

(4) 计算：10 个大方格内的细胞总数即为每微升脑脊液细胞总数，再换算成每升脑脊液细胞总数。

三、结果分析

脑脊液中 RBC 及 WBC 参考值：

正常成年人：RBC $0 \times 10^6/L$

WBC $(0 \sim 5) \times 10^6/L$ (脑室内)

儿童：WBC $(0 \sim 15) \times 10^6/L$

新生儿：WBC $(0 \sim 30) \times 10^6/L$

在本案例中，患者脑脊液中 RBC 为 $1 \times 10^6/L$ ，WBC 为 $100 \times 10^6/L$ ，由此可见患者有中枢神经系统感染。

四、注意事项

(1) 直接白细胞计数时，也可用微量吸管吸取冰醋酸后尽可能全部吹出，仅使吸管内壁黏附少许冰醋酸，再吸以少量混匀的脑脊液于吸管中，数分钟后吸管内红细胞溶解，然后再充池计数。

(2) 细胞计数时，如发现较多细胞有皱缩或肿胀等异常现象，应如实报告，以协助临床医学鉴别是陈旧性出血还是新鲜出血。

(3) 血性脑脊液中的白细胞必须校正后才有价值，校正方法是分别计数血液红细胞、白细胞数和脑脊液细胞总数、白细胞数，扣除因出血而带进脑脊液的白细胞数。

(4) 细胞涂片时，为了使细胞容易粘在玻片上，可取沉淀的细胞悬液 2 滴，加血清 1 滴，混匀后涂片。

(5) 涂片染色分类时，如见内皮细胞或异常细胞，则另行描述报告，必要时用 HE 染色查找肿瘤细胞。

(6) 实验结束后，血细胞计数板用 75%乙醇浸泡消毒 60min，忌用酚类消毒剂浸泡，以免损坏计数板。

实验六 脑脊液球蛋白试验

一、实验原理

脑脊液中球蛋白(主要是感染刺激机体产生的免疫球蛋白)与苯酚结合,形成不溶性蛋白盐而产生白色浑浊或沉淀。

二、实验材料、试剂与仪器

小试管、刻度吸管、尖滴管、饱和苯酚。

三、操作步骤

- (1)加试剂:取饱和苯酚溶液 2ml 于小试管中。
- (2)加标本:用尖滴管垂直滴加脑脊液标本 1~2 滴。
- (3)观察结果:在黑暗背景下立即用肉眼观察结果。

四、结果分析

结果判读标准:脑脊液清晰透明,不呈现云雾状为(-);呈微白雾状,对光不易看见,黑色背景下才能见到为(±);灰白色云雾状为(+);白色浑浊或白色薄云状沉淀为(++);白色絮状沉淀或白色浓云块状为(+++);立即形成白色凝块为(++++)。

本案例中患者脑脊液球蛋白实验结果为(+),说明有中枢神经系统感染存在。

五、注意事项

- (1)当室温在 10℃ 以下时,应将试剂保存在 37℃ 温箱中,否则饱和度降低,可致假阳性。
- (2)选用小内径的试管,一般为(13±1)mm,加入试剂后立即观察结果。
- (3)标本中如红细胞过多,应离心后取上清液检测。

【案例结论分析】 根据脑脊液常规、生化、免疫检查结果可以得出患者脑脊液免疫球蛋白 G 及 A、脑脊液蛋白检测值均高于正常范围,并且脑脊液病毒检测发现单纯疱疹病毒特异性抗体为(+),因此可以初步判断患者为中枢神经系统病毒感染;对患者进行抗病毒及其他对症治疗,并注意疗效观察。同时,应对患者脑脊液行真菌、细菌感染及结核感染的排查。

(张旭光 王保强)

第二章 临床生物化学检验案例分析

【案例 1】 患者，男，62 岁。

主诉：双下肢水肿加重，心前区针刺样疼痛，伴有胸闷。

现病史：近 3 天来患者出现双下肢水肿加重，心前区针刺样疼痛，伴有胸闷、憋气，反复发作，发热、乏力，偶有咳嗽、无痰，腹泻，5~6 次/天，无尿痛、尿急及肉眼血尿，睡眠好。

既往史：患者 3 年前无明显原因出现双下肢水肿，心前区不适，偶有胸闷、胸痛，无发热，无腹泻，无尿痛、尿急及肉眼血尿，当地医院诊断为“慢性肾炎”。既往体健，无药物过敏史，无特殊个人史和家族史。

体格检查：T 36.8℃，P 78 次/分，R 18 次/分，BP 130/80mmHg。贫血貌，全身皮肤及巩膜无黄染，浅表淋巴结无肿大，眼睑轻度水肿，睑结膜略苍白，甲状腺(-)、心肺(-)，腹平软，肝脾肋下未触及。双下肢中度可凹陷性水肿，双侧巴彬斯基征(-)。

辅助检查：

心电图：窦性心律、T 波改变。

超声检查：双肾不均质改变，双肾多发囊肿。

实验室检查：

血常规：WBC $6.9 \times 10^9/L$ ，RBC $2.45 \times 10^{12}/L$ ，Hb 74g/L，PLT $170 \times 10^9/L$ 。

尿常规：蛋白(+++)、隐血(+)。

初步诊断：慢性肾病、慢性贫血、冠状动脉粥样硬化性心脏病(简称冠心病)。

【问题】 为明确诊断，应做哪些相关实验室检查？

【解析】 根据患者主诉和体格检查，患者有双下肢的普遍水肿，同时涉及眼睑的水肿，结合既往史“慢性肾炎”，推测为肾源性水肿。有贫血貌，结合实验室检测，RBC、Hb 均下降，提示有贫血，尿常规检测出现蛋白(+++)、潜血(+)，提示病变原因在肾脏。进一步做超声检测后证实有双肾多发囊肿。为了进一步了解患者的肾脏损害情况，建议做肾功能检测：包括血清尿素检测、肌酐检测、尿酸检测、电解质检测等。既往病史中只有心前区不适，偶有胸闷、胸痛，现病史发现患者病情加重，出现了心前区针刺样疼痛，伴有胸闷、憋气，反复发作，心电图检测出现 T 波改变，结合患者的病史，以及肾脏的疾病，推测患者可能合并了心脏系统的疾病，初步推测是由稳定型心绞痛病情加重，演变成了不稳定型心绞痛，因此后续需要进行心肌损伤标志物的检测：包括血清肌钙蛋白、肌红蛋白、超敏 C 反应蛋白、谷草转氨酶(AST)、肌酸激酶(CK)、肌酸激酶同工酶(CK-MB)测定等。

实验一 脲酶-谷氨酸脱氢酶偶联速率法测定血清尿素

一、实验原理

尿素经脲酶催化水解生成氨和二氧化碳。在谷氨酸脱氢酶的(GLDH)的催化下，氨与 α -酮戊二酸及还原型辅酶 I (NADH) 反应生成谷氨酸与 NAD^+ 。NADH 在 340nm 波长处有吸收峰，

其吸光度下降的速率与待测样品中尿素的含量成正比。

二、实验材料、试剂与器材

- (1) 酶试剂组成成分和在反应液中的参考浓度如下：pH8.0 的 Tris-琥珀酸缓冲液 150mmol/L、脲酶 8000U/L、GLDH 700U/L、NADH 0.3mmol/L、α-酮戊二酸 15mmol/L、ADP 1.5mmol/L。
目前较多采用双试剂法，将 NADH 与 α-酮戊二酸分开保存有利于试剂稳定。
- (2) 尿素标准储存液 (100mmol/L)：精确称取于 60~65℃干燥恒重的尿素 (MW 为 60.06) 0.6g，溶解于无氨去离子水，并定容至 100ml，加 0.1g 叠氮钠防腐，4℃可保存 6 个月。
- (3) 尿素标准液 (5mmol/L)：取上述储存液 5.0ml 置 100ml 容量瓶中，用去离子水定容至 100ml。
- (4) 仪器：自动生化分析仪或有恒温装置的分光光度计。

三、操作步骤

- (1) 自动生化分析仪两点法：标本与酶试剂比为 1：100，反应温度 37℃，波长 340nm，延迟时间 30s，读数时间 60s。详细操作程序参照仪器和试剂盒说明书。
- (2) 手工法 (表 2-1)。

表 2-1

加入物 (ml)	空白管	标准管	测定管
待测血清	—	—	0.015
尿素标准液	—	0.015	—
去离子水	0.015	—	—
酶试剂	1.5	1.5	1.5

混匀后立即在附有恒温装置的分光光度计上监测吸光度变化速率，计算出各管 ΔA/min。

四、结果分析

尿素 (mmol/L) = $\frac{\text{测定管} \Delta A / \text{min} - \text{空白管} \Delta A / \text{min}}{\text{标准管} \Delta A / \text{min} - \text{空白管} \Delta A / \text{min}} \times \text{标准液浓度}$

尿素的正常参考范围是 1.8~6.8mmol/L。

本案例中尿素结果为 26.4mmol/L，明显增高。

器质性肾脏损伤时血尿素增高，尿素在肾脏损伤的早期变化不明显，但是在慢性肾衰竭，尤其是尿毒症期，血尿素升高非常明显，并且与病情的严重程度相关。

(1) 血清尿素升高的主要原因

- 1) 肾前性：最重要的原因是失水，因血液浓缩使肾血流量减少，肾小球滤过率减低而致血液尿素浓度增加，见于剧烈呕吐、幽门梗阻、肠梗阻和长期腹泻等。
- 2) 肾性：急性肾小球肾炎、肾病晚期、肾衰竭、慢性肾盂肾炎及中毒性肾炎等影响肾小球滤过的疾病，都可使血液尿素含量增高。
患者因双肾囊肿，影响了肾脏的基本滤过功能，从而使尿素等代谢物无法排出体外，在血液中浓度增高，属于肾性原因。
- 3) 肾后性疾病：前列腺肥大、尿路结石、尿道狭窄、膀胱肿瘤使尿道受压等都可能使尿路阻塞，引起血液中尿素含量增加。

(2) 血清尿素浓度降低的情况：较少见，严重肝病如急性黄色肝萎缩、肝硬化、肝炎合并广泛性坏死，导致尿素合成减少可使血液尿素浓度降低。

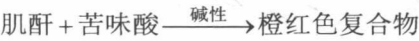
五、注意事项

- (1) 标本最好用血清，高浓度氟化物可抑制脲酶活性而使结果偏低。
- (2) 该法最常出现的问题是试剂失效或反应系统被污染。试剂中最不稳定的是 NADH 和 GLDH。
- (3) 必须用无氨去离子水复溶试剂。操作中各种实验用品均应洁净、无氨污染、无酸碱污染，在 340nm 波长下以去离子水调零，试剂空白吸光度应大于 1.0。试剂浑浊或试剂空白吸光度低于 1.0 时不宜使用。
- (4) 血氨升高可使尿素测定结果偏高，采用两点速率法能较好地消除内源性氨的干扰，采用液体型双试剂有利于试剂稳定。

实验二 碱性苦味酸法测定血清肌酐

一、实验原理

肌酐与碱性苦味酸试剂发生 Jaffé 反应生成黄红色络合物，在 510~520nm 附近选择测定吸光度值，与通过同样处理的标准液比较，即可计算出血中肌酐含量。



二、实验材料、试剂与仪器

- 1. 试剂组成
试剂 1：氢氧化钠 0.8mol/L。
试剂 2：苦味酸 24mmol/L；肌酐标准液 10μmol/L。
- 2. 仪器 全自动生化分析仪或者分光光度计。

三、操作步骤(表 2-2)

表 2-2

加入物(ml)	试剂空白	标准管	标本管
工作试剂	1.0	1.0	1.0
肌酐标准液	-	0.1	-
样品	-	-	0.1

工作试剂：试剂 1：试剂 2=1：1，混匀即可。
混匀，37℃ 延迟 20s 后在 510nm 处读取吸光度变化，读 20~60s 计算平均每分钟吸光度变化 ΔA/min。

四、结果分析

肌酐浓度(μmol/L) = $\frac{\text{样本管}\Delta A}{\text{标准管}\Delta A} \times \text{标准液浓度}$